

H Pfister

Mainz 1976

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

Elektrophoretische
Untersuchungen zur Heterogenität der sauren
Phosphatase im Ejakulat
und zur Verwendbarkeit in der
spurenkundlichen Praxis

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Zahnheilkunde
der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz,
den Medizinischen Fachbereichen

vorgelegt von

Hans Pfiester

aus Landau/Pfalz

Mainz 1976



Fachbereichsdekan: Professor Dr. med. P. Klein

Referent: Professor Dr. med. G. Walther

Korreferent: Professor Dr. med. H. Leithoff

Inhalt

	Seite
Einleitung	1
Die saure Phosphatase und ihre Bedeutung in der gerichtlichen Medizin - Fragestellung	2
Material und Methode	5
Die Vorversuche	7
Ergebnisse der Vorversuche	9
Die Hauptversuche	11
Ergebnisse der Hauptversuche	12
Diskussion	15
Zusammenfassung	20
Literaturverzeichnis	21



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547917_0049

Die saure Phosphatase und ihre Bedeutung in der gerichtlichen Medizin

Phosphatasen sind Enzyme, die die Veresterung bzw. die hydrolytische Spaltung von Phosphorsäureestern katalysieren. Entsprechend ihrem jeweiligen pH-Optimum lassen sie sich in "saure" und "alkalische" Phosphatasen unterteilen.

Seit den Untersuchungen von KUTSCHER u. Mitarb. sowie von GUTMAN u. GUTMAN (10,11,24,25,26,) wissen wir, daß in der menschlichen Prostata saure Phosphatase in außergewöhnlich hoher Aktivität gebildet und im Ejakulat ausgeschieden wird. Man glaubte daher, durch qualitative (3,5) oder durch quantitative (9,12,21-23,36,46) Bestimmung der sauren Phosphatase einer Spur den Spermanachweis sicher führen zu können.

Enzyme mit sehr ähnlichen katalytischen Eigenschaften findet man jedoch recht häufig in biologischem Material, was angesichts der zentralen Stellung von Phosphorverbindungen im Stoffwechsel nicht überrascht. So kommt saure Phosphatase vor beispielsweise in Blumenkohl und Malerblume (15,31), in Milch (4,48), in Ananas (16), im Sekret des Schneckenfußes (17,44), in Hefe (38), in verschiedenen Bakterienkulturen (6,18,37), in Kartoffeln (33,53), wobei diese Aufzählung nur einen geringen Teil aller untersuchten Materialien erfaßt. Wenn auch die enzymatische Aktivität in diesem Material meist wesentlich niedriger liegt als die normale Prostataphosphatase-Aktivität, sind doch Meßwerte angegeben, die vergleichbar oder sogar höher sind als manche im Ejakulat ermittelten Werte. (9,14,28). Auch kann die normale Phosphatase-Sekretion der Prostata durch pathologische

Prozesse oder medikamentöse Beeinflussung herabgesetzt sein (40,41). Da es außerdem keine verlässliche Methode gibt, das Alter eines Fleckes und die Menge der verursachenden Flüssigkeit zu bestimmen, sahen sich HAUCK, LEITHOFF, LIETZ, PROKOP und WEYRICH (14,31,32,44,56) zur Kritik an der Anwendung der Phosphatasereaktionen veranlaßt. Danach konnten auf dem alleinigen Phosphatase-nachweis basierende Methoden nur als Vorprobe gewertet werden.

Bald jedoch stieß man auf die Möglichkeit, die molekulare Heterogenität der sauren Prostataphosphatase zur Differenzierung heranzuziehen. Diese war im letzten Jahrzehnt von zahlreichen Autoren untersucht und nachgewiesen worden. So konnten VERNON und Mitarb. (53) mittels Ultrazentrifugation, andere Untersucher mittels Chromatographie an DEAE-Cellulose und Gelfiltration aus Prostataextrakten zwei Fraktionen darstellen (8, 43,51). SMITH und WHITBY dagegen trennten durch Stärkegel-Elektrophorese zwanzig Komponenten voneinander (49). HÖHN (17) konnte menschliche Spermaphosphatase durch Discelektrophorese von einer Reihe von Phosphatasen anderer Herkunft differenzieren.

Im Ganzen gesehen sind die Berichte über die Heterogenität der Prostataphosphatase jedoch recht uneinheitlich und die Ergebnisse nicht immer genügend reproduzierbar. Auch wurde über unterschiedliches Verhalten von Prostata- und Spermaphosphatase berichtet (51).

Bereits 1949 hatten ABDUL-FADL und KING die Prostataphosphatase mit der sauren Phosphatase der Erythrozyten verglichen und deren Unterschiede und Gemeinsamkeiten herausgearbeitet. 1963 stellten HOPKINSON u. Mitarb. mit Hilfe der Stärkegel-Elektrophorese bei der Erythrozytenphos-

phatase ebenfalls einen Polymorphismus fest. Sie trennten das Enzym in 2-3 Zonen unterschiedlicher Aktivität und Wanderungsgeschwindigkeit, deren Anordnung eine Typisierung der sauren Erythrozytenphosphatase ermöglichte. So kennt man heute sechs Phänotypen ihres elektrophoretischen Verhaltens; da ihr Vererbungsmodus bekannt ist, hat ihre Bestimmung zur Klärung der Abstammung breiten Eingang in die gerichtsmedizinische Praxis gefunden. Seltener - nur bei Vorliegen sehr frischer Blutspuren - läßt sich das Verfahren in der Spurenkunde zur Täteridentifikation anwenden (7).

Im Hinblick auf diese Befunde und ihre weitere Detaillierung (LAI et al.,27) wandten UENO und YOSHIDA die etwas modifizierte Technik von HOPKINSON u. Mitarb. an, um einen entsprechenden Polymorphismus der sauren Prostata-Phosphatase darzustellen. Sie erreichten eine Auftrennung in 4-5 Banden, nach deren Verhalten im elektrischen Feld sie die Prostata-Phosphatase in drei Typen einteilten. Eine Korrelation zwischen dem Erythrozyten-Phosphatasetyp und dem Prostata-phosphatasetyp fand sich nicht. Für die Typen der Prostata-Phosphatase beschrieben die Autoren ein Auftreten in unterschiedlichen Häufigkeiten. Ihrer Ansicht nach handelt es sich damit um Gruppenfaktoren, die Hinweise zur Täteridentifikation geben können.

Ziel dieser Arbeit war es, die von UENO und YOSHIDA angegebene Technik auf die praktische Anwendbarkeit zu überprüfen und zu untersuchen, ob die für japanische Männer festgestellte Typenverteilung auf hiesige Verhältnisse übertragen werden kann.

Material und Methode

Die Untersuchungen wurden an Spermaproben von Patienten der Fertilitätssprechstunde der Hautklinik durchgeführt. Diese Proben lagerten bei $+4^{\circ}\text{C}$ bis zur Aufarbeitung. Um den Einfluß der Lagertemperatur zu überprüfen, wurde von vier Proben je die Hälfte entnommen und bei -25°C bis zu sieben Tage lang gelagert.

Als Aufarbeitung erfolgte zehn Minuten lange Zentrifugation der Proben bei 3000 U/min. Von dem Überstand wurde 0,1 ml entnommen und mit 0,05 M Zitronensäure/Zitratpuffer pH 5,0 verdünnt. Es wurden folgende Verdünnungsreihen angesetzt:

1 : 10, 1 : 15, 1 : 20, 1 : 50, 1 : 100.

Bei der angewandten Elektrophorese handelt es sich um das Prinzip der Stärkegel-Elektrophorese nach SMITHIES (50) mit waagrecht angeordneten Platten. Für einen Teil der Vorversuche wurde in Anlehnung an die Arbeit von UENO und YOSHIDA eine Kammer selbst entwickelt und gebaut. Für die späteren Untersuchungen wurden Glasplatten von 20x20 cm Größe benutzt. In die erste Kammer wurde das Gel bis zu einer Höhe von 5 mm eingegossen, auf die Glasplatten dagegen mit einem Streichgerät (Fa. DESAGA, Heidelberg) aufgetragen, welches auf 3 mm Schichtdicke eingestellt war. Für die Herstellung des Gels fand hydrolysierte Stärke zur Serumelektrophorese nach SMITHIES der Firma Connaught Medical Research Laboratories, Toronto, sowie von Biotest Verwendung. Die Stärkelösung wurde in Konzentrationen zwischen 9 und 15% angesetzt mit Essigsäure-Phosphatpuffer in pH-Werten von 4,0 bis 7,0 (0,2 M Essigsäure, 0,2 M Dinatriumhydrogenphosphat).

Dieser Puffer wurde zum Ansetzen der Stärkelösung im Verhältnis 1 : 100 verdünnt. Die Platten wurden in einer Entfernung von 2 cm von der Kathode durch Einstecken von Filterpapierstreifen beimpft. Es wurden hierfür 3 x 6 mm große Zuschnitte benutzt (Schleicher & Schüll, Prod.Nr. 2043b Mgl), welche in dem verdünnten Samenplasma getränkt wurden. Während der Elektrophorese schützte eine dünne Plastikfolie (Kalle) üblicher Haushaltsqualität das Gel vor Austrocknung. An den Rändern wurde zusätzlich mit Vaseline abgedichtet.

Als Brückenpuffer wurde der bereits erwähnte 0,2 M Essigsäure/Phosphatpuffer verwendet. Die Verbindung zwischen Brückenpuffer und Elektrophoresekammer bzw. Gel erfolgte durch eine dreifache Lage Filtrierpapierstreifen (Schleicher & Schüll, Nr. 0958). Als Elektrode diente gewendelter Platindraht. Dieser befand sich in einer Elektrodenschale analog der Brückenpufferschale (Fa. Rubbermaid), die auch den gleichen Puffer enthielt. Die Verbindung zwischen beiden Schalen wurde durch Filterkartonstreifen (Schleicher & Schüll, Nr. 2727) hergestellt. Als Spannungsgeber diente das Gerät von Quickfit & Quarz für die Discelektrophorese. Es wurden Spannungen zwischen 100 und 220 Volt eingestellt. Hierbei betrug die Stromstärke im allgemeinen zwischen 8 und 15 mA. An dem Gerät können Spannung oder Strom konstant gehalten werden. Die Laufzeiten dauerten zwischen 18 und 22 Stunden bei +4°C (Kühlschrank). Die Inkubation der Gele erfolgte mit einer Lösung von 0,6 g Phenolphthaleindiphosphat-Pentanatriumsalz in 100 ml 0,05 M Zitronensäure/Natriumzitratpuffer pH 5,0. Die Inkubationszeit betrug zwei Stunden bei +37°C. Nach der Inkubation wurde die Substratlösung abgegossen und das Gel mit 5%igem Ammoniumhydroxyd bestrichen.

Die Vorversuche

Im Verlauf der Vorversuche sollte die günstigste Einstellung für die angelegte Spannung, den pH-Wert des Gelpuffers, die Verdünnung des Samenplasmas und die Stärkekonzentration ermittelt werden. Auch wurden verschiedene Methoden zur Beimpfung des Gels erprobt, bis die oben beschriebene als günstigste zur Routineanwendung kam.

Unter Konstanzhaltung der übrigen Parameter wurden Spannungen von 105 bis 220 Volt gewählt und in dreizehn Versuchen die erhaltenen Laufstrecken verglichen. Dabei waren in zehn Versuchen jeweils zwei Gelplatten gleichzeitig über den gleichen Brückenpuffertrog parallel angeschlossen, um eine bessere Beurteilung der Gleichmäßigkeit der Bedingungen zu ermöglichen. (siehe Tab. 1)

U	T	I	PLZ	U	T	I	PLZ
105	20	11	1	190	20	20	2
120	19	22	2	190	25	15	2
140	21	32	1	200	20	10	1
145	20	10	2	200	20	20	2
175	20	12	2	220	21	20	2
175	20	15	2	220	20	18	2
175	26	14	2				

Tab.1 : Die Spannung als Parameter.

U = Spannung in Volt, T = Zeit in Stunden, I = Stromstärke in mA, PLZ =Plattenzahl pro Versuch.

Die Tabelle zeigt die Staffe lung der angewandten Spannungen mit den zugehörigen Stromstärken und Laufzeiten. Die Angabe der Plattenzahl erlaubt den Vergleich der Stromstärken.

Die trotz gleicher Spannung auftretenden Stromstärkedifferenzen haben zum großen Teil ihre Ursache in

unterschiedlichen Übergangswiderständen vom Gel zum Brückenpapier, wie entsprechende Versuche ergeben haben. Die Schwankungen lassen sich durch ausreichend langes Durchfeuchten der Brücken vor dem Anbringen reduzieren.

Zur Ermittlung der geeigneten Wasserstoffionenkonzentration in Gel und Brückenpuffer dienten zehn Versuche mit vierzehn Gelplatten. Dabei wurden Werte zwischen pH 4,0 und pH 7,0 (vor allem aber Werte im Bereich von pH 5,0 und 5,3) mittels Glaselektrode eingestellt (siehe Tabelle 2).

PL	PR	Z	pH	PL	PR	Z	pH
1	3	4	6,0	8	31-41,61,66	12	5,2
2	3	4	7,0	9	33,38,50-58,61	11	5,2
3	4	4	4,0	10	8,51,52,61,63	5	5,3
4	4	4	4,5	11	59-68,38,49,52	13	5,3
5	8,51,52,58,59,	11	4,8	12	59-68,38,49,52	13	5,3
6	61-64	11	5,0	13	52-61	10	5,3
7	8,51,52,61,63	5	5,0	14	50-54	8	5,3

Tab. 2: Der pH-Wert als Parameter.

PL = Plattennummer, PR = Nummer der verwendeten Proben, Z = Zahl der Proben pro Platten, pH = pH-Wert der Gelplatte. Die Tabelle zeigt die erprobten Gel-pH-Werte zusammen mit den für die Untersuchung verwendeten Proben.

Die Versuche zur Bestimmung der günstigsten Samenplasmaverdünnung überschnitten sich zum Teil mit den beiden erstgenannten Versuchsreihen, wobei Proben gleicher Herkunft in unterschiedlichen Verdünnungsstufen auf dasselbe Gel verimpft wurden. So wurde im einzelnen sieben mal die Verdünnung 1:10, fünf mal 1:15, zehn mal 1:20, sieben mal 1:50, neun mal 1:100 bei der Aufarbeitung angewandt (siehe auch Tab.2: Probennummern).

Ergebnisse der Vorversuche

1. Lagertemperatur

Die Kontrolluntersuchungen der bei -25°C bis zu sieben Tage gelagerten Proben ließen keine Unterschiede erkennen, die auf die abweichende Lagertemperatur zurückzuführen wären.

2. Einfluß der Spannung

Bei der Spannungswahl zeigten sich die besten Resultate bei 100 - 120 Volt mit einer Laufzeit von zwanzig Stunden. Unter diesen Bedingungen und bei Kühlschranktemperatur ist eine wesentliche Erwärmung des Gels nicht zu befürchten, ebenso fehlen stärkere Eintrocknungserscheinungen und Randeffekte, wie sie bei erheblich längeren Laufzeiten mit geringerer Spannung beobachtet werden können. Die Front der Enzymfraktionen ist bei den erwähnten Bedingungen in etwa 7 - 9cm Entfernung von der Kathode angeordnet. Erhöht man die Spannung auf über 150 - 220 Volt, so sind die Banden meist zu stark gedehnt und verlieren an Schärfe. Es kommt am Übergang des Gels zur Papierbrücke zu deutlichen Schrumpfungerscheinungen der Gele, besonders an der Anode. Dies ist vermutlich teils durch die höhere Stromstärke, teils durch stark unterschiedliche Konzentrationen von Brücken- und Gelpuffer bedingt (49).

3. Einfluß des pH-Wertes

Bei den extremen Einstellungen der Platten 1 - 4 (s. Tab. 2), nämlich pH 7,0, pH 6,0, pH 4,0, pH 4,5, ergab sich keine Anfärbung auf den Platten 1 und 2, eine sehr kurze Laufstrecke auf Platte 3 und eine Wanderung zur Kathode auf Platte 4. Daher wurden diese pH-Werte nicht mehr eingestellt. Eine Wanderung zur Kathode war auch bei pH 4,8 festzustellen, selbst bei

pH 5, 0 trat gelegentlich eine Anfärbung in dieser Richtung auf, selten auch bei pH 5, 2. In diesen Fällen war manchmal auch die kathodenwärts gerichtete Aktivität in bis zu sechs Banden aufgeteilt. Mit pH 5, 3 war jedoch im Hinblick auf die Laufrichtung stets ein einheitliches Bild zu erreichen, weshalb dieser Wert in den Hauptversuchsreihen eingestellt wurde.

4. Einfluß der Samenplasmaverdünnung

Beim Vergleich der unterschiedlich stark verdünnten Proben erwies sich eine Verdünnung von 1:20 als günstig. Höhere Konzentrationen erschwerten im allgemeinen die Unterscheidung von einzelnen Banden, da bei höherer Phosphataseaktivität dann eine zu intensive Anfärbung in Form eines undifferenzierten Flecks auftrat. Umgekehrt war bei zu geringer Konzentration die Anfärbung gelegentlich so schwach, daß manche Proben keine sichtbare Aktivität mehr hatten.

5. Eignung der verwendeten Elektrophoresekammern

Die für einen Teil der Vorversuche benutzten Kammern aus klarem Hart-PVC mit Glas- bzw. PVC-Boden wurden für die Hauptversuche nicht verwendet.

Zum einen ließ sich das Stärkegel mit dem erwähnten Streichgerät auf Glasplatten selbst in dünner Schicht noch gleichmäßig auftragen, wobei mehrere Platten gleichzeitig beschichtet werden konnten, zum anderen erlaubte die größere Breite der Glasplatten (20 cm) ein Verimpfen von bis zu dreizehn Proben je Gel. Dieser Vorteile in der Handhabung wegen wurden die Gele der Hauptversuchsreihe nach diesem Verfahren hergestellt.

6. Eignung der Stärkefabrikate und -konzentration

Nach einem Testlauf mit Vergleich von BIOTEST-Stärke und Stärke der Connaught Medical Research Laboratories

konnte kein wesentlicher Unterschied gesehen werden. Ebenso waren Variationen der Stärkekonzentration des Gels im Bereich von 11% bis 15% ohne erkennbaren Einfluß auf das Ergebnis, sodaß in den Hauptversuchen immer die von UENO und YOSHIDA angegebene Konzentration von 13% verwendet wurde.

Hauptversuche

In die Hauptversuche wurden 75 Ejakulate von 75 Männern einbezogen, das heißt, daß es sich um jeweils ein Ejakulat eines einzelnen Patienten handelte. Zunächst erfolgte eine Einfachuntersuchung aller 75 Proben. Sie sollte klären, ob und im welchen Umfang die Methode von UENO und YOSHIDA eine Auftrennung der sauren Phosphatase erreichen kann. Dazu wurden die erhaltenen Pherogramme nach ihrem Aussehen beurteilt und in die drei folgenden Kategorien eingeordnet:

1. Ungefärbt : Das Gel wies nach Inkubation und Alkalisierung keine Färbung auf.
2. Gefärbt : Das Gel zeigte deutliche Färbung. Eine Aufteilung des rosaroten Bezirks in Zonen oder Banden war nicht erkennbar.
3. Differenziert: Die Anfärbung im Gel wies eine mehr oder weniger deutliche Querstreifung auf.

Im weiteren sollte untersucht werden, ob die Ergebnisse der ersten Versuchsreihe, besonders die gelungenen Auftrennungen, stets reproduzierbar sind. Dazu wurden achtzehn Proben mehrfach untersucht und die Resultate nach den gleichen erwähnten Kriterien ermittelt. Besonders berücksichtigt wurden Proben, die beim ersten Lauf Auftrennung gezeigt hatten. Von diesen wurden zwölf, von den

beiden anderen Kategorien wurden je drei verwendet.

Durch die Zählung der Banden bei denjenigen Pherogrammen, bei denen eine Auftrennung oft genug gelang, sollte ermittelt werden, wie zuverlässig die Trennung ist. Von zehn Proben wurden daher die in 70 Läufen erhaltenen Bandenzahlen verglichen.

Bei einigen Pherogrammen wurden darüber hinaus die Entfernung der ersten Bande zum Startpunkt vermessen, um deren Eignung als Beurteilungskriterium zu überprüfen.

Ergebnisse der Hauptversuche

Von den gesamten 75 Einzelelektrophoresen zeigten 30 (entspricht 40%) nur einen mehr oder weniger scharf begrenzten Farbfleck (= Kat. 2). 30 Pherogramme ließen eine Auftrennung in mehr als eine enzymaktive Zone erkennen (entspr. 40%, = Kat. 3). Die restlichen fünfzehn Elektrophoresen waren nicht angefärbt (entspr. 20%, = Kat. 1). Tabelle drei zeigt die Zusammenfassung dieser Ergebnisse.

Die 180 Mehrfachuntersuchungen von 18 Proben ergaben 90 angefärbte, 8 ungefärbte und 82 differenzierte Pherogramme. Dabei waren auch die in der ersten Untersuchung ungefärbten Proben meist gefärbt oder sogar differenziert. Die Proben der Kategorie drei aus Tabelle drei zeigten kein einheitliches Verhalten. Sie erbrachten 5 ungefärbte, 58 gefärbte und 57 differenzierte Pherogramme (Tab. vier).

In Tabelle fünf ist die Anzahl der Banden von zehn verschiedenen Ejakulaten in 70 Pherogrammen dargestellt.

Der Vergleich ergibt:

1. Am häufigsten finden sich 4 Banden (22 mal), am zweithäufigsten 3 (16 mal), dann 5 Banden (11 mal).
2. Die Zuordnung einer bestimmten Bandenzahl zu einer bestimmten Probe ist nicht gerechtfertigt.

P	1	2	3	P	1	2	3	P	1	2	3
1	x			26		x		51	x		
2	x			27		x		52	x		
3	x			28	x			53			x
4		x		29		x		54			x
5	x			30	x			55		x	
6		x		31		x		56		x	
7		x		32			x	57	x		
8	x			33		x		58	x		
9		x		34		x		59		x	
10		x		35		x		60	x		
11		x		36		x		61		x	
12		x		37		x		62		x	
13			x	38	x			63			x
14			x	39		x		64		x	
15			x	40		x		65		x	
16			x	41		x		66			x
17			x	42		x		67	x		
18			x	43		x		68		x	
19	x			44		x		69			x
20		x		45		x		70	x		
21		x		46			x	71			x
22	x			47		x		72	x		
23	x			48		x		73		x	
24			x	49		x		74		x	
25			x	50		x		75		x	
	8	8	9		4	8	13		3	14	8

P	1	2	3
5	0	8	2
8	1	7	2
31	0	5	5
21	2	5	3
39	0	3	7
56	0	4	6
13	0	5	5
14	0	5	5
15	0	4	6
16	1	3	6
17	0	10	0
33	0	3	7
37	0	5	5
47	1	3	6
48	0	2	8
50	0	3	7
65	2	7	1
66	1	8	1
	8	90	82

Tab. 3: Die Auftrennbarkeit der Proben
Von 75 Proben zeigten 30 Anfärbung, 30 Auftrennung, die übrigen keine Farbreaktion.

Tab. 4: Konstanz der Trennbarkeit
Außer Nr.17 läßt keine Probe konstantes Verhalten erkennen.

In beiden Tabellen bedeuten: 1 = ungefärbt = Kategorie 1, 2 = gefärbt = Kategorie 2, 3 = differenziert = Kategorie 3.
P = Probennummer.

Abschließend wurden die Laufstrecken von 12 Proben gemessen. Die Ergebnisse dieser Versuche sind aus Tabelle sechs zu entnehmen, ebenso die Anzahl der Messungen jeder Probe. Aus den angegebenen Entfernungen ergibt sich, daß diese Strecke bei ein und derselben Probe sehr unterschiedlich ausgefallen war. Zwar fanden sich bei einigen Proben mehrere Werte im Bereich von 10 - 15 mm, jedoch auch deutlich größere und kleinere.

P	BZ →							
	1	2	3	4	5	6	7	8
47			1	3	1	1	1	
48			1	2	2	1		1
54			2	2		1	2	
14			2	3		1	1	
13			2	2	2	1		
46				3	1			3
50		2	1	1	1	2		
49				4	1		1	1
33	2		2	1	2			
39			5	1	1			
	2	2	16	22	11	7	5	5

Tab. 5: Anzahl der Enzymfraktionen
P = Probennummer, BZ = Bandenzahl. Die Zahlen 1-8 in der ersten Zeile bedeuten die Bandenzahlen. Senkrecht darunter jeweils die Häufigkeiten bei den unter "P" angegebenen Proben.
Die Zahlen 3,4,5 sind bevorzugt. Keine Probe hat jedoch eine für sie charakteristische Bandenzahl.

Tab. 6: Laufstrecken

P = Probennummer, E = Entfernung zwischen Startpunkt und erster Bande nach dem Startpunkt in mm.

Auch hier unterschiedliche Resultate bei Mehrfachuntersuchungen gleicher Proben, z.B. 54, 47, 48.

P	E								
54	5	10	11	13	14	23	43	45	
48	7	9	10	18	21	23	26	30	
47	3	19	23	28	33	38			
31	9	10	10	15	18				
59	10	11	20	33					
56	3	15	30	44					
46	19	20	22	36					
33	20	28	33						
45	9	12	18						
49	11	11	15						
55	12	12	14						
58	12	19	41						

Faßt man die Ergebnisse zusammen, so muß man feststellen, daß mit Hilfe der Dünnschichtstärkegelelektrophorese die Heterogenität der sauren Phosphatase des Ejakulates bestätigt wird. Auch sind die von UENO und YOSHIDA angegebenen methodischen Bedingungen im wesentlichen geeignet, die saure Phosphatase zu fraktionieren. Dies betrifft vor allem die Bedingungen der Gelbeschaffenheit, die Stärke und Art des Puffers sowie die Laufzeit und die Spannung. Allerdings ist zu empfehlen, den pH-Wert des Gelpuffers um 0,3 auf pH 5,3 zu erhöhen, da sonst ein Teil der Enzymfraktionen kathodenwärts wandern kann.

Es ist jedoch hervorzuheben, daß unter den geschilderten Bedingungen nicht immer eine Auftrennung gelang. So wurden von 75 Proben der ersten Versuchsreihe nur 30 differenziert. Auch die Mehrfachuntersuchung dieser Proben ergab nicht einmal in 50% der Fälle differenzierte Pherogramme. Betrachtet man die Anzahl der gefundenen Enzymfraktionen, wie es Tabelle fünf zeigt, so fällt die erhebliche Inkonzanz auf. So wies die Probe Nr. 46 zwar dreimal je vier Banden auf, jedoch wurden auch dreimal acht Banden beobachtet. Die Probe Nr. 47 wurde einmal in drei, dreimal in vier, einmal in fünf, einmal in sechs und einmal in sieben Fraktionen aufgespalten. Die Probe Nr. 49, die im Hinblick auf die Laufstrecken eine relative Konstanz aufwies, zeigte nichts dergleichen in Bezug auf die Bandenzahl. Bei ihr wurden viermal vier, einmal fünf, einmal sieben und einmal acht Enzymfraktionen gefunden.

Wie bei den Bandenzahlen war auch bei den Laufstrecken im allgemeinen eine ausreichende Reproduzierbarkeit der Ergebnisse nicht erreicht worden. So wurden bei der Probe Nr. 54 für die erste Bande Strecken zwischen 5 und 45 mm gemessen. Diese Entfernung vom Startpunkt zur ersten Bande ist jedoch für die Klassifikation der sauren Prostataphosphatase nach

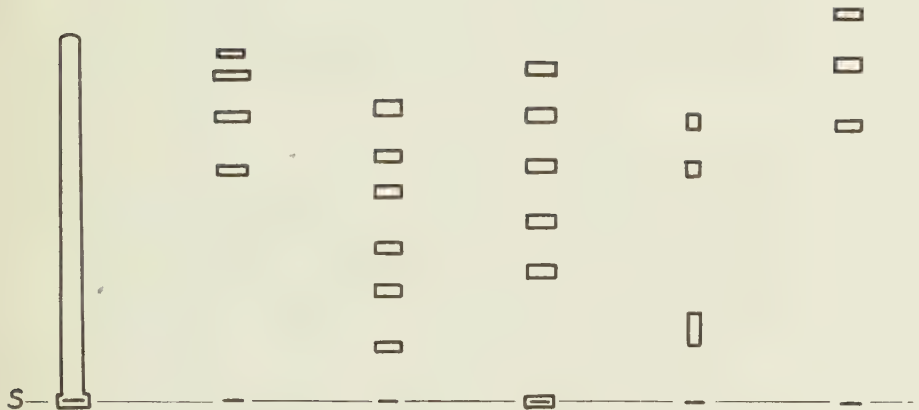


Abb. 1: Sechs verschiedene Pherogramme der Probe Nr. 61
(Schemazeichnung)

S = Startlinie; Laufrichtung nach oben

Nach Durchzeichnung auf Klarsichtfolie wurden diese Pherogramme der Probe 61 ausgewählt und die Banden zur Rechteckform schematisiert. Die Zeichnung läßt die Unterschiede in Bandenzahl und Laufstrecken erkennen. Ganz links ein undifferenziertes Pherogramm.

UENO und YOSHIDA von größter Bedeutung: Ist diese erste Zone direkt hinter dem Startpunkt lokalisiert, dann sprechen sie von einem Phosphatasetyp "Slow", liegt sie weiter entfernt, dann sprechen sie von einem Typ "Fast". Von beiden unterscheiden sie einen dritten Typ "Zero", der überhaupt nicht wandert. Diese Klassifikation läßt sich aber mit den hier beschriebenen Befunden nicht in Einklang bringen, denn die Entfernungen variieren zu stark. Abbildung 1 zeigt dies exemplarisch anhand der Ergebnisse der Probe Nr. 61.

Damit stellt sich die Frage nach den Ursachen der unterschiedlichen Ergebnisse. Zunächst ist daran zu denken, daß unter bestimmten Gegebenheiten die enzymatische Aktivität einzelner Banden so gering ist, daß sie unterhalb der Empfindlichkeitsschwelle der angewandten Färbetechnik liegt. Somit könnten einzelne Banden in Abhängigkeit von diesen vermuteten Gegebenheiten manchmal erkennbar sein, manchmal nicht. Betrifft aber diese geringe oder gar fehlende Anfärbung eine oder mehrere Banden unmittelbar hinter dem Startpunkt, so würde bei der Messung zwangsläufig nicht die erste, sondern eine weiter anodenwärts gelegene Bande erfaßt. Die Ablesung einer zu großen Laufstrecke wäre die Folge. Möglicherweise bestehen die erwähnten Gegebenheiten in methodischen Ungenauigkeiten. Wahrscheinlich läßt sich eine gleichmäßige, gut reproduzierbare Bandenauftrennung nur mit sehr eng definierten Versuchsbedingungen realisieren. Es können also schon geringe Abweichungen, die noch innerhalb der Toleranzgrenzen der benutzten Meßgeräte liegen, zu auffälligen Änderungen im Pherogramm führen. Eine solche Störanfälligkeit macht die Eignung der Technik für die Routineanwendung zumindest fraglich.

Ein wichtiger Grund der Inkonstanz der Untersuchungsergebnisse ist in der Inkonstanz der sauren Phosphatase selbst

- wie fast aller Parameter des Ejakulates - zu sehen. Erwähnt sei hier zunächst nur die Gesamtaktivität der sauren Phosphatase, die - mit o-Carboxyphenylphosphat bestimmt - zwischen 10^4 und 10^6 U schwankt. (54, 55). Was die Heterogenität der sauren Spermaphosphatase betrifft, so können eine Reihe von Publikationen einen Eindruck von der Vielgestaltigkeit dieser Heterogenität vermitteln. VERNON (53), ANGELETTI (2), ESTBORN (8), OSTROWSKI und RYBARSKA (43) wandten Chromatographie an DEAE-Cellulose, Gelfiltration und Ultrazentrifugation an, um aus Prostataextrakten zwei enzymatisch aktive Eiweiße zu isolieren.

SHULMAN und FERBER (47) konnten dagegen mit immunologischen Methoden fünf distinkte Proteine mit den Eigenschaften der sauren Phosphatase nachweisen.

KASCHNITZ (20) fand mit der Discelektrophorese vier, LUNDIN und ALLISON (34, 35) jedoch 13-17 Komponenten, ebenso viele wie SUR und Mitarbeiter (51) und LUNDIN und ALLISON (34, 35) mit der Stärkegelelektrophorese aufzeigten.

Im Ejakulat fanden OEPEN und Mitarbeiter (42) zwei, HÖHN (17) zwei bis drei Fraktionen.

Von Interesse sind schließlich noch die Befunde von SMITH und WHITBY (49). Sie stellten mit Stärkegelelektrophorese mindestens zwanzig Zonen der Prostataphosphatase aus Gewebsextrakten dar. Durch Inkubation mit hochgereinigter Neuraminidase konnten sie das Pherogramm im Sinne einer Verringerung der Zonenzahl und einer Verlagerung der Hauptaktivität verändern. Da die von ihnen isolierten Fraktionen keine signifikanten Unterschiede in der Enzymkinetik aufwiesen, vertreten die Autoren die Auffassung, die elektrophoretische Heterogenität der

sauren Phosphatase werde durch unterschiedlich lange Seitenketten aus Neuraminsäuren an einem sonst gleichförmigen Eiweißkörper bedingt.

Abschließend soll noch einmal auf die eingangs aufgestellte Arbeitshypothese bezüglich der Frage der Täteridentifikation eingegangen werden. Es muß festgestellt werden, daß die Phosphatase des Seminalplasmas in der Stärkegelelektrophorese unterschiedliche Laufgeschwindigkeiten aufweist. Diese Angabe von UENO und YOSHIDA ist zu bestätigen. Die Befunde sind jedoch nur schlecht zu reproduzieren, wie sich in den zahlreichen Mehrfachbestimmungen erwies. Auch OEPEN und Mitarbeiter verweisen besonders auf diese Inkonstanz. Von einer Anwendung zur Identifizierung der Herkunft einer Spermaspur in der forensischen Praxis muß daher bei dem derzeitigen Stand der Verfahrenstechnik abgeraten werden.

Zusammenfassung

Mit Hilfe der Dünnschicht-Stärkegelelektrophorese wurde die Heterogenität der sauren Spermaphosphatase untersucht. Dabei sollte die Brauchbarkeit zur Täteridentifikation im Mittelpunkt stehen.

Die Versuchsbedingungen wurden entsprechend den Empfehlungen von UENO und YOSHIDA zur Modifikation des Verfahrens von HOPKINSON und Mitarbeitern (19) gestaltet.

Pherogramme von 75 verschiedenen Ejakulaten kamen zur Untersuchung und Auswertung. Sie zeigten ein sehr unterschiedliches und inkonstantes Verhalten

1. hinsichtlich der Trennbarkeit: nur 40% ließen überhaupt eine Auftrennung in Banden erkennen
2. im Falle einer Auftrennung: hinsichtlich der Bandenzahl und Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld. Es wurden zwischen einer acht Banden gesehen und Laufstrecken von 5 bis 45 mm gemessen.

Diese Eigenschaften der sauren Phosphatase sind somit zur Täteridentifikation nicht geeignet. Als mögliche Ursachen der wechselnden Ergebnisse kommen neben einer methodischen Störanfälligkeit vor allem die Inkonstanz der sauren Spermaphosphatase selbst - sowohl in qualitativer wie auch in quantitativer Hinsicht - in Betracht.

Literaturverzeichnis

1. ABDUL-FADL, M.A.M. und E.J. KING: Properties of the Acid Phosphatases of Erythrocytes and of the Human Prostate Gland.
Bioch. J., Cambridge 45, 51-60, 1949
2. ANGELETTI, P., B. MOORE, V. SUNTZEFF und R. GAYLE: Prostatic Fraction of Acid Phosphatase in Human Serum.
Proc.Soc.Exper.Biol.Med., New York 108, 53-55, 1961
3. BERG, S.: Methoden zum Nachweis von Genitalsekretspuren.
Dtsch.Z.ges.gerichtl.Med. 42, 605-613, 1954 (Berlin)
4. BINGHAM, G.W., L. JASEWIEZ und C.A. ZITTLE: Acid Phosphatase in Cream and Skim Milk.
Science, Columbus 44, 1247-1256, 1961
5. BOLTZ, W. und U. PLOBERGER: Der enzymatische Nachweis kleinster Mengen menschlichen Ejakulats in der forensischen Praxis.
Arch.Kriminol., Lübeck 117, 17-22, 1956
6. CANNON, F.D. und C.V.Z. HAWN: Phosphatase Activity of Staphylococcus aureus.
J. of Bacteriology, Baltimore 86, 1052-1056, 1963
7. DOTZAUER, G. und T. NAGATA: Nachweis und Typenbestimmbarkeit der sauren Erythrozytenphosphatase in Blutspuren.
Z.Rechtsmedizin 67, 359-363, 1970
8. ESTBORN, B.: Separation of Phosphatase Isoenzymes by Gelfiltration.
Z.Klin.Chem., Berlin 2, 53-54, 1964

9. FISHER, R.S.: Acid Phosphatase Tests as Evidence of Rape.
New Engl.J.Med., Boston 240, 738-739, 1949
10. GUTMAN, A.B. und E.B. GUTMAN: Acid Phosphatase Activity of the Semen of Normal Human Subjects.
Proc.Soc.Exper.Biol.Med., New York 38, 470-473, 1938
11. GUTMAN, A.B. und E.B. GUTMAN: Acid Phosphatase as Functional Activity of the Prostata of Man; Praeputial Glands of the Rat.
Proc.Soc.Exper.Biol.Med., New York 39, 529-532, 1938
12. HANSEN, P.F.: Determination of the Prostata Acid Phosphatase as a New Method for Medico-legal Demonstrations of Spermaspots.
Acta Path.et Microbiol.Scandinav., Kopenhagen 23, 187-195, 1946
13. HERMANN, G! : Immunelektrophoretische Untersuchungen am menschlichen Spermaplasma.
Clin.Chim.Acta, Amsterdam 4, 116-123, 1959
14. HAUCK, G. und H. LEITHOFF: Phosphatasebestimmung als gerichtsmedizinischer Spermanachweis.
Dtsch.Z.ges.gerichtl.Med., Berlin 49, 5-17, 1959
15. HAUCK, G. und H. LEITHOFF: Beobachtungen über das Vorkommen von Phosphatasen in Gartenpflanzen.
Deutsche Apothekerzeitung, 99. Jhg., Stuttgart 15, 351-352, 1959
16. HEINICKE, R.M.: Pineapple Stem Acid Phosphatase.
Food Research, Cambridge 26, 52-62, 1961

17. HÖHN, P., WALTHER, G. und H. LEITHOFF: Discelektrophoretische Differenzierung saurer Phosphatasen verschiedener Herkunft.
Z.Rechtsmed. 68, 129- 137, 1971
18. HOLSTEN, B.V. und J. PORATH: Purification of some Properties of an Acid Phosphatase from Escherichia coli.
Biochim.Biophys.Acta, New York 64, 1-12, 1962
19. HOPKINSON, D.A., N. SPENCER und H. HARRIS: Red Cell Acid Phosphatase Variants. A New Human Polymorphism.
Nature, London 199, 969-971, 1963
20. KASCHNITZ, R.: Discelektrophoretische Trennung von Isoenzymen der sauren Phosphatase der Prostata.
Z.Klin.Chem. und Klin.Biochem., Berlin 3, 126-128, 1967
21. KAYE, S.: The Acid Phosphatase Test of Seminal Stains.
Am.J.Police Sci. (in J.Crim.Law and Criminol.)
Chicago 41, 834-835, 1951
22. KAYE, S.: Acid Phosphatase Test for Identification of Seminal Stains.
J.Lab. and Clin.Med., St.Louis 34, 738, 1948
23. KAYE, S.: Identification of Seminal Stains.
J.Crim.Law and Criminol., Chicago 38,79-83, 1947
24. KUTSCHER, W. und A. WOLBERGS: Prostataphosphatase I
Zschr.f.physiol.Chemie, Berlin 239, 237-240, 1935
25. KUTSCHER, W. und A. WÖRNER: Prostataphosphatase II
Mitteilung Zschr.f.physiol.Chemie, Berlin 239,
109-126, 1936

26. KUTSCHER, W. und J. PANY: Prostataphosphatase III
Mitteilung Zschr.f.physiol.Chemie, Leipzig 255,
169-189, 1938
27. LAI, L., S. NEVO und A.G. STEINBERG: Acid Phosphatase
of Human Red Cells Predicted Phenotype Conforms to a
Genetic Hypothesis.
Science, Washington 145, 1187-1188, 1964
28. LEITHOFF, H.: Neue Methoden der gerichtsmedizinischen
Untersuchung von Spermaflecken.
Fortschr.d.Med., München 82, 493-497, 1964
29. LEITHOFF, H.: Der gerichtsmedizinische Spermanachweis.
Habilitationsschrift der Med. Fakultät Freiburg, 1962
30. LEITHOFF, H. und I. LEITHOFF: Verteilung der sauren
Phosphatase und der Spermien im Spermafleck.
Vortrag V.Kongr.d.intern.Akad.f.gerichtl. und soziale
Medizin, Wien, 86-87, 1961
31. LEITHOFF, H. und G. KUZIAs: Über den Beweiswert des
Nachweises saurer Phosphatase bei der forensischen
Spermauntersuchung.
Dtsch.Z.ges.gerichtl.Med., Berlin 46, 260-261, 1957
32. LIETZ, S.TH.: Untersuchungen über den qualitativen
Nachweis der sauren Phosphatase in Spermaflecken.
Diss. Bonn, 1954
33. LORA-TOMAYO, M.: Spécificité de la phosphatase acide de
pomme de terre et son inhibition par des composés
organophosphoriques.
Bulletin de la Société de Chimie biologique, Paris 20,
502-512, 1962

34. LUNDIN, L.G. und A.C. ALLISON: Acid Phosphatase from Different Organs and Animal Forms Compared by Starch-Gelelectrophoresis.
Acta Chem.Scand., Kopenhagen 20, 2579-2592, 1966
35. LUNDIN, L.G. und A.C. ALLISON: Acid Phosphatase from Different Organs and Animal Forms Compared by Starch-Gelelectrophoresis.
Biochim.Biophys.Acta, Amsterdam 127, 527-529, 1966
36. LUNDQUIST, F.: Medico-legal Identification of Seminal Stains Using the Acid Phosphatase Test.
Arch.Path., Chicago 50, 395-399, 1950
37. MCCARTHY, B.J. und C. HINSHELWOOD: The Phosphatase Activity of Bacterium lactis aerogenes.
Proc. of the Royal Society, Ser. B. Biological, London 150, 474-485, 1959
38. McLELLAN, L.M. und J.O. CAMPEN: The Acid Phosphatase of Yeast Localization and Secretion by Protoplasts.
Bioch.Biophys.Acta, New York, 67, 324-326, 1963
39. MUELLER, B.: Zur Technik des Spermanachweises.
Dtsch.Z.ges.gerichtl.Med., Berlin 6, 384-396, 1926
40. NIKOLOWSKY, W.: Über Abwegigkeiten der Prostata-sekretion bei Prostatorrhoe.
Zschr.Urol., Leipzig 43, 233-236, 1950
41. NIKOLOWSKY, W.: Der Gehalt des Ejakulates an Phosphatase bei wiederholten Untersuchungen ohne und mit medikamentöser Behandlung im Intervall.
Zschr.Urol., Leipzig 43, 94-107, 1950

42. OEPEN, J., W. RENNINGER, R. HILGERMANN und C. HIRSCH-
HÄUSER: Darstellung der sauren Phosphatase in Sperma-
spuren.
Ärztl.Lab. 17, 47-54, 1971
43. OSTROWSKI, W. und S. RYBARSKA: Studies on Human
Prostatic Phosphomonoesterase. Further Purification
and Molecular Weight of Enzyme.
Biochim.Biophys.Acta, Amsterdam 165, 196-198
44. PROKOP, O.: Forensische Medizin. 2.Auflage, S.427
45. REES, B., T.J. ROTHWELL und J. BONNAR: Correlation of
Phosphoglucomutase Isoenzymes in Blood and Semen.
The Lancet 27, 783-791, 1974
46. RIISFELD, O.: Acid Phosphatase Employed as a New Method
of Demonstrating Seminal Spots in Forensic Medicine.
Acta Path.et Microbiol.Scand., Kopenhagen 58, 1-80, 1946
47. SHULMAN, S. und J.M. FERBER: Multiple Forms of
Prostatic Acid Phosphatase.
J. of Reproduction and Fertility, Oxford II, 295-297, 1966
48. SCHWARZ, G., J. LUDWIG und A. FRICKER: Über einige
Beobachtungen bei der Phosphatasebestimmung in Milch.
Die Nahrung. Chemie, Physiologie, Technologie
Berlin 6, 688-692, 1962
49. SMITH, J.K. und L.G. WHITBY: The Heterogenity of
Prostatic Acid Phosphatase.
Biochim.Biophys.Acta, Amsterdam 151, 607-618, 1968

50. SMITHIES, O.: Zone Electrophoresis in Starchgel: Group Variations in the Serum Proteins of Normal Human Adults. Biochem.J., Cambridge 61, 629-641, 1955
51. SUR, B.K., D.W. MOSS und E.J. KING: Apparent Heterogenity of Prostatic Acid Phosphatase. Biochem.J., Cambridge 84, 55, 1962
52. UENO, S. und H. YOSHIDA: The Electrophoretic Heterogenity of Prostatic Acid Phosphatase. Z.Rechtsmed. 72, 169, 1973
53. VERNON, C.A., J. GAULDIE und J.M. HANSON: Acid Phosphatase. Nature, London 208, 382-383, 1965
54. WALTHER, G.: Über die Verwendung von o-Carboxyphenylphosphat zum Nachweis saurer Phosphatase im Sperma. Dtsch.Z.ges.gerichtl.Med. 66, 1-8, 1969
55. WALTHER, G. und P. HÖHN: Aktivitätsbestimmung der sauren Phosphatase in verschiedenen biologischen Medien unter Verwendung von o-Carboxyphenylphosphat. Z.Rechtsmed. 69, 259-262, 1971
56. WEYRICH, G.: Spermanachweis. Arch.f.Kriminol., Lübeck 118, 154, 1956

Lebenslauf

Am 9. März 1950 wurde ich als drittes Kind des Angestellten Ernst Pfiester und seiner Ehefrau Anneliese in Landau/Pfalz geboren.

1957 in die Grundschule eingeschult, wechselte ich 1961 über zum Otto-Hahn-Gymnasium Landau. Dort erhielt ich 1969 das Zeugnis der Reife.

Ende 1969 schrieb ich mich bei der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz zum Studium der Zahnheilkunde ein. 1972 legte ich die zahnärztliche Vorprüfung ab; im gleichen Jahr heiratete ich meine Frau Christa.

Nach bestandenem Staatsexamen wurde mir am 30. Oktober 1974 die Bestallung als Zahnarzt erteilt.

Seit Januar 1975 bin ich in einer zahnärztlichen Praxis in Römerberg bei Speyer als Assistent tätig.

Idee und Anregung zu dieser Arbeit stammen von Herrn Professor Dr. med. H. Leithoff, Direktor des Institutes für Gerichtliche Medizin der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, und Herrn Professor Dr. med. G. Walther vom gleichen Institut.

Ihnen möchte ich für ihre Anregungen und für ihre großzügige Unterstützung herzlichen Dank sagen.

Ferner gilt mein Dank Herrn Professor Dr. Walther für seine stete Bereitschaft, die bei der Durchführung der Arbeit auftretenden Probleme klären zu helfen.

Herrn Professor Dr. med. G. Korting, Direktor der Universitätshautklinik, danke ich für die Überlassung der Proben.

